

ANTIOXIDIZER IN ORGANISM

Patent Number: JP11323328
Publication date: 1999-11-26
Inventor(s): NISHINO TOMOHIKO; ISHIKAWA FUMIYASU
Applicant(s): YAKULT HONSHA CO LTD
Requested Patent: JP11323328
Application Number: JP19980133086 19980515
Priority Number(s):
IPC Classification: C09K15/22; A23C9/12; A61K35/20; A61K35/74
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To enhance antioxidizing activity of aminocarbonyl compounds by inoculating a composition containing the aminocarbonyl compounds with a lactic acid bacteria and culturing the resultant.

SOLUTION: At least 3 wt.%, preferably 10-20 wt.% of amino compounds of a protein, an amino acid or the like are reacted with at least 2 wt.%, preferably 5-15 wt.% of reducing sugar or the like at a temperature of 100-121 deg.C for 7-90 min to prepare aminocarbonyl compounds of L-value 65-85. A lactic acid bacteria of leuconostoc lactics, lactobacillus casei, lactobacillus rhamnosus, lactobacillus delbrueckii subspecies, bulgaricus or the like is inoculated on a composition containing the aminocarbonyl compounds and the resultant is cultured in the pH up to 4. Thus, antioxidizing activity of aminocarbonyl compounds can be enhanced without being required severe heat conditions.

Data supplied from the **esp@cenet** database - 12

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-323328

(43) 公開日 平成11年(1999)11月26日

| | | |
|---------------------------|------|----------------|
| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | F I |
| C 0 9 K 15/22 | | C 0 9 K 15/22 |
| A 2 3 C 9/12 | | A 2 3 C 9/12 |
| A 6 1 K 35/20 | | A 6 1 K 35/20 |
| 35/74 | ADD | 35/74 ADDG |
| // C 1 2 N 1/20 | | C 1 2 N 1/20 A |

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平10-133086 | (71) 出願人 | 000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号 |
| (22) 出願日 | 平成10年(1998)5月15日 | (72) 発明者 | 西野 智彦 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内 |
| | | (72) 発明者 | 石川 文保 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内 |
| | | (74) 代理人 | 弁理士 有賀 三幸 (外4名) |

(54) 【発明の名称】 生体内抗酸化剤

(57) 【要約】

【解決手段】 アミノカルボニル化合物を含有する組成物に、乳酸菌を接種し培養することを特徴とするアミノカルボニル化合物の生体内抗酸化活性増強方法、及びこの方法で得られた組成物を有効成分とする生体内抗酸化剤。

【効果】 風味、外観が良好で生体内抗酸化活性の高い抗酸化剤が得られる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノカルボニル化合物を含有する組成物に乳酸菌を接種し培養することを特徴とするアミノカルボニル化合物の生体内抗酸化活性増強方法。

【請求項2】 アミノカルボニル化合物を含有する組成物が乳製品の加熱処理物である請求項1記載の方法。

【請求項3】 アミノカルボニル化合物を含有する組成物が、無脂乳固形分換算で3重量%以上の乳製品及び2重量%以上の還元糖を含有する混合乳製品を加熱することにより得られるL値65～85の乳製品である請求項1記載の方法。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の方法により得られた組成物を有効成分とする生体内抗酸化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、乳製品及び還元糖を混合加熱等して得られるアミノカルボニル化合物の生体内抗酸化活性を増強する方法及びこの方法により得られた生体内抗酸化剤に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、生体内の活性酸素の発生、過酸化脂質の生成、蓄積が、悪性腫瘍や動脈硬化等の種々の疾病の原因となることが報告されている。従って、生体内の活性酸素等の発生を抑制すべく生体内抗酸化活性（以下、「抗酸化活性」という）を有する物質が注目されている。

【0003】抗酸化活性を有する物質としては、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、尿酸等のラジカル消去剤や、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等の酵素剤が報告されている。また、特開平4-264034号公報には、乳酸菌菌体もしくは菌体抽出物を有効成分とする過酸化脂質抑制剤が開示されている。

【0004】これらのうち、ビタミン群や乳酸菌は食品として使用されているものの、ビタミンA及びEは脂溶性であるため適用範囲が限定されてしまい、ビタミンCには保存中の安定性が悪いという問題がある。また、ビタミン群等を飲食品中に添加すると、保存中に他の成分と反応して抗酸化活性が低減する場合もあり、殺菌工程を経ることにより黒色の凝集物が生ずることもある。他方、乳酸菌菌体自体の有する抗酸化活性は、必ずしも満足できるものではなかった。

【0005】また、特許2686934号公報には、糖類とアミノ酸類によるアミノカルボニル反応生成物（以下、アミノカルボニル化合物という）を有効成分とする生体内過酸化脂質抑制剤が開示されている。アミノカルボニル化合物は優れた保存安定性を有しているものの、その抗酸化活性は必ずしも十分ではなかった。

【0006】一方、醗酵乳等の乳製品を製造する際、脱脂粉乳等の乳製品を加熱殺菌することにより乳製品中の

乳タンパク質と乳糖がアミノカルボニル反応を起こし、アミノカルボニル化合物が生成することもわかっている。生成するアミノカルボニル化合物の量は加熱の条件が厳しい程増加する傾向があり、増加に従って抗酸化活性を増す。このため、十分な抗酸化活性を得るためには、厳しい加熱条件が必要となるが加熱条件が厳しいと乳製品の物性が変化し、凝集、分離、風味劣化等の問題が生じてしまう。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、このような厳しい加熱条件を必要としないアミノカルボニル化合物の抗酸化活性の増強方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】斯かる実情に鑑み本発明者は鋭意研究を行ったところ、アミノカルボニル化合物を含有する組成物に乳酸菌を接種し、培養すれば、意外にもアミノカルボニル化合物自体の抗酸化活性が増強されることを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち本発明は、アミノカルボニル化合物を含有する組成物に、乳酸菌を接種し培養することを特徴とするアミノカルボニル化合物の生体内抗酸化活性増強方法、及びこの方法で得られた組成物を有効成分とする生体内抗酸化剤を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明でアミノカルボニル化合物とは、アミノカルボニル反応、すなわち、タンパク質、アミノ酸等のアミノ化合物と還元糖等のカルボニル化合物との加熱反応による生成物の総称をいう。ここでアミノ化合物としては、乳タンパク質、BSA、大豆タンパク質、小麦タンパク質、卵タンパク質、畜肉タンパク質、魚介タンパク質、グリシン、ヒスチジン、アルギニン等が、カルボニル化合物としては、グルコース、フルクトース、キシロース、アラビノース等の還元糖が挙げられる。ここで用いるアミノ化合物は、これが含まれる乳製品であってもよい。

【0011】本発明に用いるアミノカルボニル化合物を含有する組成物は、一般に強く加熱したもの程、アミノカルボニル化合物の量が多くなり、抗酸化活性も高いが、風味、色調が損なわれているおそれがある。

【0012】そこで色調の変化をL値で捉え、加熱条件を設定する。L値とは明度（明るさの度合い）を示す値であり、この値が高い程明るいのである。すなわち、アミノカルボニル化合物は褐色を呈するため、その量が増加する程、L値は低下するのである。

【0013】好ましいL値とするため、加熱条件の他、アミノ化合物量、カルボニル化合物量等も考慮する。好ましいL値は、乳製品の場合85以下である。ただしL値が65未満となると抗酸化活性が頭打ちとなるのみならず風味、外観の劣化のおそれがある。従って、乳製品

を原料とする場合、加熱後のL値は65～85になるよう加熱条件等を設定することが望ましい。

【0014】また、乳製品の場合、L値を65～85の範囲内としたい場合には、乳製品を無脂乳固形分換算で3重量%以上、特に10～20重量%、カルボニル化合物、特に還元糖を2重量%以上、特に5～15重量%とすることが好ましい。これらの濃度が低すぎるとアミノカルボニル反応を進めるために厳しい加熱条件が必要となり、凝集が生じる等の問題が起こることがある。本発明で用いる乳製品としては、具体的には、牛乳・山羊乳などの生乳、脱脂粉乳、全脂粉乳、生クリーム等が挙げられる。

【0015】乳製品、醗酵乳を製造する場合、アミノカルボニル反応を行うための加熱は、殺菌工程において行えばよい。その際の殺菌条件は、乳製品や還元糖の濃度によって異なるものの、おおむね100℃～121℃で7～90分とすればよい。このとき、殺菌条件が厳しすぎると製品中で分離等が生ずるため、これに留意して適宜条件を設定する必要がある。

【0016】このようにして得られたアミノカルボニル化合物を含有する組成物は本発明方法により、更に抗酸化活性を高めることができる。

【0017】本発明方法では、アミノカルボニル化合物を含有する組成物に乳酸菌を接種し、これを培養する。ここで用いる乳酸菌としては、特に限定されないが、ロイコノストック・ラクチス (*Leuconostoc lactis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・ラムノーザス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・デルブルッキイ サブスピーシーズ、ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 等が好ましく、特に、プロテアーゼ活性の高いロイコノストック・ラクチス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・ラムノーザス、ラクトバチルス・デルブルッキイ サブスピーシーズ、ブルガリカスがより好ましい。乳酸菌培養の程度は、基質たるアミノカルボニル化合物含有組成物の種類、アミノカルボニル化合物含有量、乳酸菌の菌種等により適宜決定すればよいが、乳製品を原料とし、L値が65～85である組成物の場合は、pH4程度まで培養を行うことが好ましい。また乳製品を原料とする場合、ビフィドバクテリウム属細菌や酵母等を乳酸菌と共に接種培養してもよく、これらは前培養あるいは後培養してもかまわない。

【0018】上記の如くして得られた培養物は抗酸化剤としてそのまま、又は希釈して用いることができ、また飲料、食物、餌に添加して用いてもよい。

【0019】

【発明の効果】本発明の方法によれば、色調、風味の変化が少なく、アミノカルボニル化合物の抗酸化活性を高めることができる。本発明の乳酸菌培養による抗酸化活性増強効果は、単に乳酸生成によるpH低下に依存するものではないと考えられる。すなわち、同一の基質を乳酸添加によりpH低下させた場合には増強作用は得られないのである。また、乳酸菌培養後に遠心分離等の手段を用いて乳酸菌菌体を回収し、基質の抗酸化活性を測定しても、培養前よりも抗酸化活性が増強されており、このことから、抗酸化活性の増強が単に乳酸菌菌体の有する活性に由来するものではないことがわかる。従って、本発明による抗酸化活性増強効果は、乳酸菌の産生する乳酸及びプロテアーゼによりアミノカルボニル化合物の構造変化が起こり、このことが抗酸化活性の増強にかかわっているものと考えられる。

【0020】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】参考例1 L値と抗酸化活性の相関

乳製品を加熱し、アミノカルボニル反応を行った場合のL値と抗酸化活性との相関を検討した。

【0022】(1) 乳製品の調製

重量換算で、20%の脱脂粉乳と10%の果糖ブドウ糖液糖を温水に溶解し、乳製品を調製した。

【0023】(2) アミノカルボニル反応

(1)の乳製品を100℃、0～120分の加熱殺菌処理に供し、アミノカルボニル反応を行った。こうして、各々L値の異なる乳製品5種類を調製した。

【0024】(3) 抗酸化活性の測定

(2)で得られた乳製品5種類のL値を測定した。測定には安定なフリーラジカルであるDPPH (2, 2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル) の特性、すなわち、抗酸化物質と接触することにより青紫色 (Abs. 517nm) から無色に変化する性質を利用した。測定方法としては次の通りである。まず、(2)で得られた乳製品とDPPH溶液を混合し、30分室温で放置する。次いで、混合物のAbs. 517を測定し、その減少の度合いによって活性を判定した。なお、抗酸化活性が0.45程度よりも高くなるとDPPHは、ほぼ無色になってしまう。このため、それ以上の抗酸化活性を有するサンプルについては、水で希釈を行った後希釈倍率を乗じて活性値とした。

【0025】(4) 結果

L値と抗酸化活性との相関を図1に示す。図からわかるように、加熱殺菌により乳製品のL値が低下するのに伴い、抗酸化活性は増強された。また、L値が65以下になると抗酸化活性の増強は見られなくなった。

【0026】参考例2

参考例1において加熱殺菌により増強された抗酸化活性

が、アミノカルボニル化合物に由来するかを確認した。

【0027】(1) 乳製品の分画及び抗酸化活性の測定
参考例1(1)の乳製品及びこれを100℃で30～90分加熱した4つのサンプルをゲル濾過カラム(Sephadex G-25 カートリッジ カラム)を用いて分画した。サンプルを400 μ lアプライし、溶出をイオン交換水で行った。分取1mlずつ行い最初から順番にフラクション1から14を得た。次に、各フラクションの抗酸化活性を参考例1と同様に測定した。結果を図2に示す。

【0028】(2) アミノカルボニル化合物の確認

(1)において、加熱条件を厳しくすることにより抗酸化活性の増強されたフラクション8と増強されなかったフラクション12を選出し、未殺菌及び100℃、90分殺菌の各々のサンプルの抗酸化活性及びアミノカルボニル化合物量を測定し、加熱による影響を検討した。アミノカルボニル化合物量の測定は、アミノカルボニル化合物に特異的な吸光度(Abs. 280nm及びAbs. 420nm)を測定することにより確認した。吸光度の測定には分光光度計UV-150(島津株式会社製)を用いた。抗酸化活性の測定結果を図3に、アミノカルボニル化合物量を図4に示す。図3において、フラクション8を殺菌したサンプルの抗酸化活性が図2と比べて低いのは、サンプルを希釈しておらず、DPPHが無色になってしまったためである。フラクション8では加熱により抗酸化活性、アミノカルボニル化合物量が共に増加したのに対し、フラクション12では変化は見られなかった。これにより、抗酸化活性の増強がアミノカルボニル化合物量の増加に由来することが示された。また、フラクション8よりも前に溶出され活性が存在した画分においても、アミノカルボニル化合物の増加による色調の変化を目視により確認できた。

【0029】実施例1 乳酸菌培養の及ぼす影響の検討
脱脂粉乳15重量%、果糖ブドウ糖10重量%の乳製品に関し、以下(1)～(4)の条件にてサンプルを調製した。これらの抗酸化活性を参考例1と同様に測定し、乳酸菌培養が抗酸化活性に及ぼす影響について検討した。このとき、サンプル(2)と(4)では、カードが形成されたため、クエン酸Naを添加後攪拌してカードを可溶化した。可溶化されなかったものは遠心分離により除去した。

(1) 100℃、30分加熱

(2) 100℃、30分加熱後、ラクトバチルス・カゼ

イ FERM BP-1366株でpH3.6まで培養

(3) 121℃、15分加熱

(4) 121℃、15分加熱後、ラクトバチルス・カゼ

イ FERM BP-1366株でpH3.6まで培養

その結果、いずれの加熱条件においても乳酸菌培養により抗酸化活性が増強された(図5)。なお、DPPHを用いた抗酸化活性の測定系が乳酸菌の乳酸産生に伴うpHの低下に影響されているかも別途検討した。すなわち、水(ラクトース)及び乳酸を添加した水の抗酸化活性を比較したところ、両者に差は見られず、pH低下と抗酸化活性との間に相関はないことが示唆された。

【0030】実施例2

乳酸菌培養による抗酸化活性の増強が、乳製品中のどの成分に由来しているのかを検討した。

(1) 分画及び抗酸化活性の測定

参考例1(1)の乳製品を100℃、30分加熱殺菌したサンプル、及びこれをラクトバチルス・カゼイ FERM-BP1366で37℃、5日間培養した培養乳製品をゲル濾過カラム(Sephadex G-25 カートリッジ カラム)を用いて分画した。サンプルを400 μ lアプライし、溶出をイオン交換水で行った。分取1mlずつ行い最初から順番にフラクション1から14を得た。各フラクションの内、抗酸化活性の高かったフラクション9と活性の低かったフラクション12を選出し抗酸化活性を実施例2と同様に測定した(表1)。その結果、アミノカルボニル生成物の多いフラクション9は培養により抗酸化活性が増強され、生成物の少ないフラクション12の活性は増強されなかった。

【0031】

【表1】

| | フラクション9 | フラクション12 |
|-----|---------|----------|
| 培養前 | 0.27 | 0.01 |
| 培養後 | 0.4 | 0.01 |

【0032】実施例3

表2に示す4種類のサンプルを調製し、参考例1と同様に抗酸化活性を測定した。その結果、加熱、乳酸菌培養により、抗酸化活性が増強されることが示された(図6)。

【0033】

【表2】

| 処方 | 殺菌 | 乳酸菌発酵 |
|-------------------|----------|-----------|
| 20%脱脂粉乳 | 無 | 無 |
| 10%果糖ブドウ糖 | 無 | 無 |
| 20%脱脂粉乳+10%果糖ブドウ糖 | 100℃、90分 | 無 |
| 20%脱脂粉乳+10%果糖ブドウ糖 | 100℃、90分 | pH4.0まで発酵 |
| 水(コントロール) | 無 | 無 |

【0034】実施例4

使用する乳酸菌の菌種が抗酸化活性に影響するかを検討した。

(1) 乳製品の調製及びアミノカルボニル反応

参考例1の(1)と同様に乳製品を調製し、同(2)と同様にアミノカルボニル反応を行った。

(2) 使用菌株

乳酸菌培養には、ラクトバチルス・アシドフィルス YIT0168株、ラクトバチルス・デルブルッキ サブピーシーズ、ブルガリカス YIT0181株、ラクトバチルス・カゼイ FERM BP-1366株、ラクトバチルス・ラムノーザス YIT0105、ストレプトコッカス・サーモフィルス YIT2001株、ロイコノストック・ラクチス YIT3001株を使用した。

【0035】(3) 乳酸菌の培養

乳酸菌の培養は、(1)でアミノカルボニル反応を行った乳製品を基質として5日間行った。培養温度はロイコノストック・ラクチスのみが26℃で、他の菌株は37℃とした。また、培養期間中1日毎にサンプリングを行い、pH、及び抗酸化活性を測定した。結果を図7、8に示す。図8からいずれの菌株を用いても抗酸化活性が増強されることがわかる。

【0036】実施例5

乳酸菌培養による抗酸化活性の増強が乳酸菌菌体の有する活性に由来するかを検討した。

(1) 乳製品の調製及びアミノカルボニル反応

参考例1の(1)と同様にして乳製品を調製し、100℃、30分及び100℃、90分の条件でアミノカルボニル反応を行った。

(2) 乳酸菌培養及び菌体の回収

(1)で得られた乳製品にラクトバチルス・カゼイ FERM BP-1366株を0.5重量%接種し、37℃で3日間培養した。このとき、培養液のpHは3.9であった。更に、得られた培養液を十分攪拌した後、10,000rpm、10分遠心分離し、菌体及びカードを回収した。

【0037】(3) 抗酸化活性の測定

培養前の乳製品を乳酸でpH3.9に調製したサンプル(培養なし)と、(2)で菌体及びカードを除去した遠心上清(培養あり)について実施例1と同様に抗酸化活性を測定した。その結果、菌体回収後の培養液の方が活

性が高いことが確認され、乳酸菌培養により抗酸化活性の増強されていることがわかった(図9)。

【0038】実施例6

単に菌体数が増加したのみでは抗酸化活性の増強は、ほとんど観察されないことを証明すべく、培養させたものと単に菌体を培養前の培地に加えたものとの抗酸化活性を比較した。ここで抗酸化活性は参考例1に準じて測定した。添加した菌数は表3に示し結果を表4及び図10に示す。なお図中で培地は参考例1(1)の乳製品を100℃、30分間加熱したものであり、未培養、培養及び培地は次の意味を示す。

【0039】未培養：参考例1(1)の乳製品にMRS培地で培養した菌体を集菌、洗浄後添加したもの

培養：参考例1(1)の乳製品にラクトバチルス・カゼイ FERM BP-1366株接種し2日間培養させたもの

いずれも(加熱殺菌)は100℃、30分間、また、培養は200mlとした。

【0040】

【表3】

| 培地 | 生菌数 |
|--------|--------------------|
| MRS | 2.29×10^9 |
| 培養した菌数 | 6.04×10^9 |

【0041】

【表4】

| 希釈倍率 | 未発酵 | 発酵 | 培地 |
|------|-------|-------|-------|
| 1.0 | 0.179 | 0.04 | 0.178 |
| 2.0 | 0.185 | 0.081 | 0.185 |
| 5.0 | 0.377 | 0.238 | 0.389 |
| 10.0 | 0.494 | 0.327 | 0.485 |

【0042】結果

接種前の培地とMRS培地で培養した菌体(2.29×10^9)を培地に添加したサンプル間には顕著な差は見られなかった。一方、乳酸培養させた培地のみ、明らかに活性が上昇していた。このことからこの活性上昇における菌体の効果は培養したものと比較して非常に小さいものであることが分かった。

【図面の簡単な説明】

【図1】殺菌（加熱）時間と抗酸化活性の関係を示す図である。

【図2】フラクシオン毎の活性を示す図である。

【図3】殺菌の前後の活性を示す図である。

【図4】殺菌の前後の活性を示す図である。

【図5】希釈倍率と活性との関係を示す図である。

【図6】各乳製品の活性を示す図である。

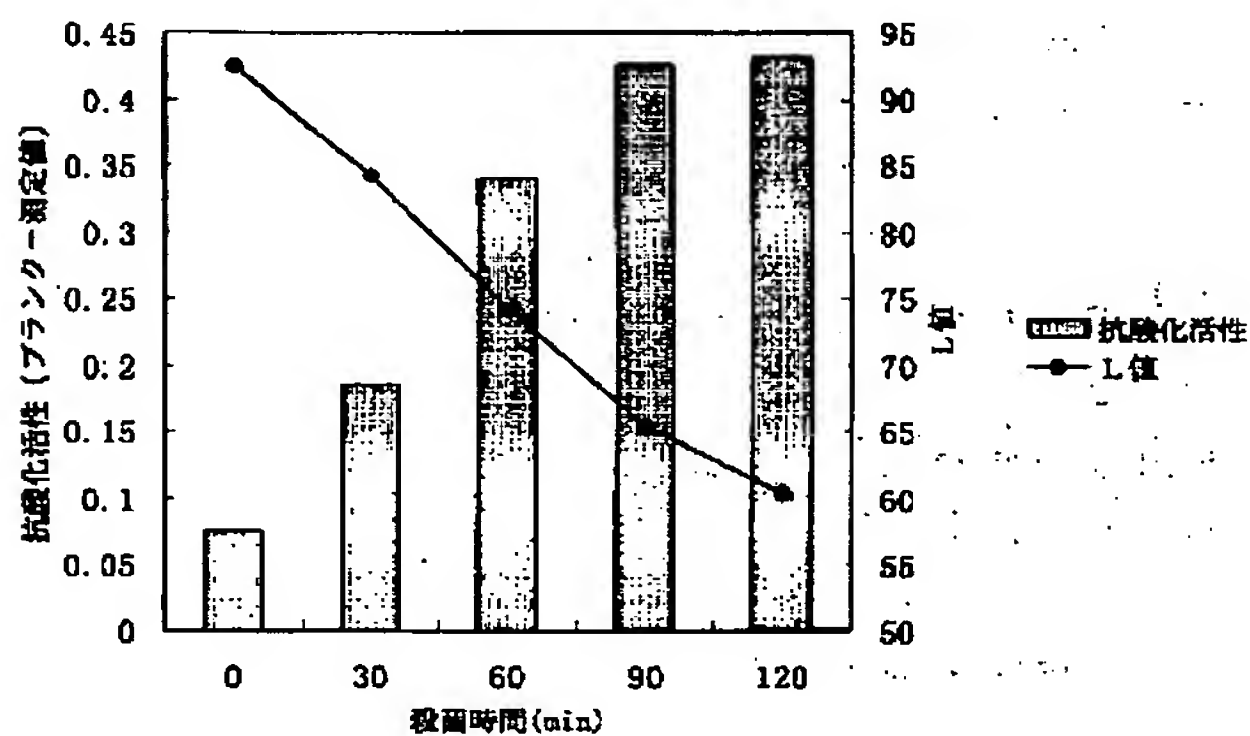
【図7】培養日数とpHとの関係を示す図である。

【図8】培養日数と活性との関係を示す図である。

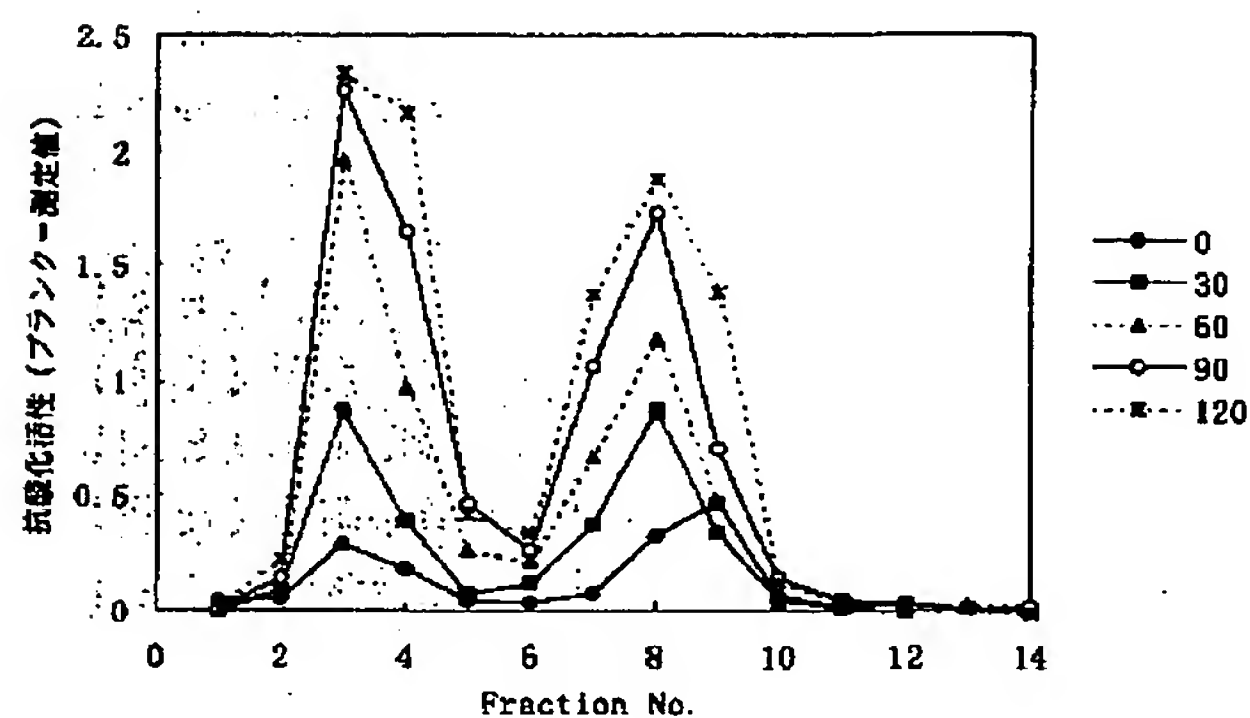
【図9】殺菌条件と活性との関係を示す図である。

【図10】希釈倍率と活性との関係を示す図である。

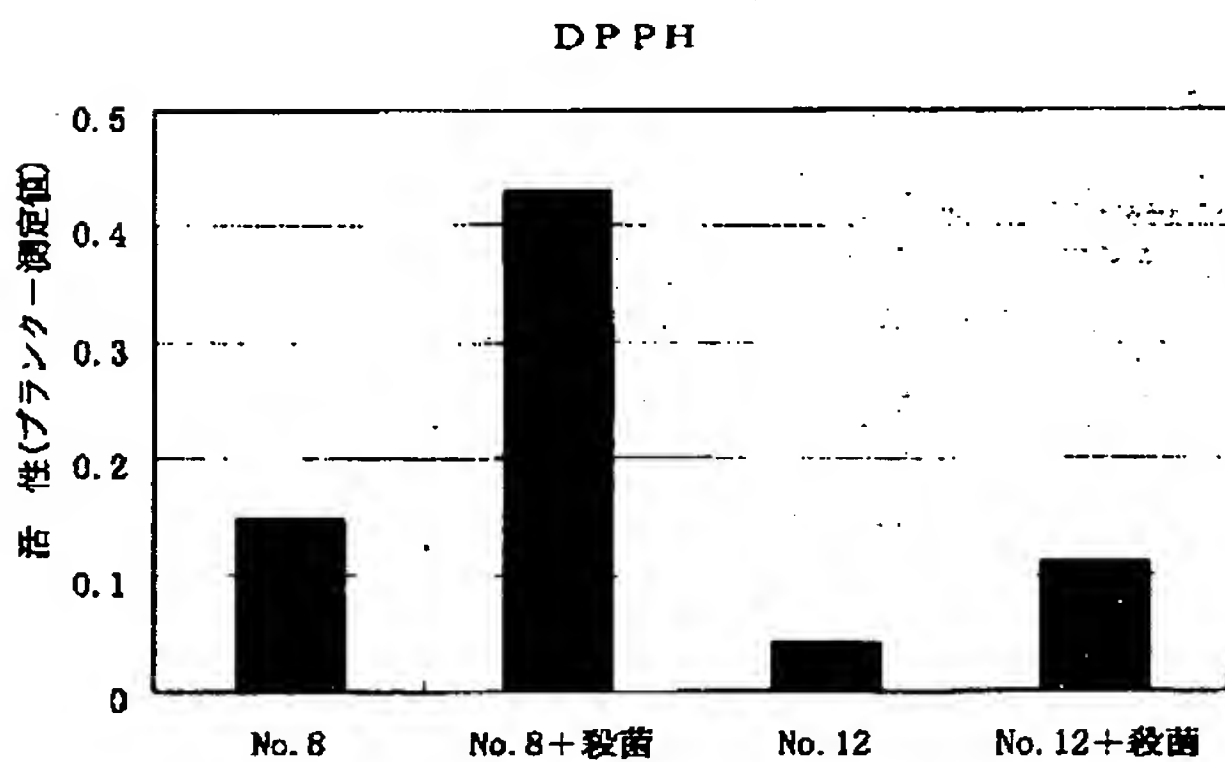
【図1】



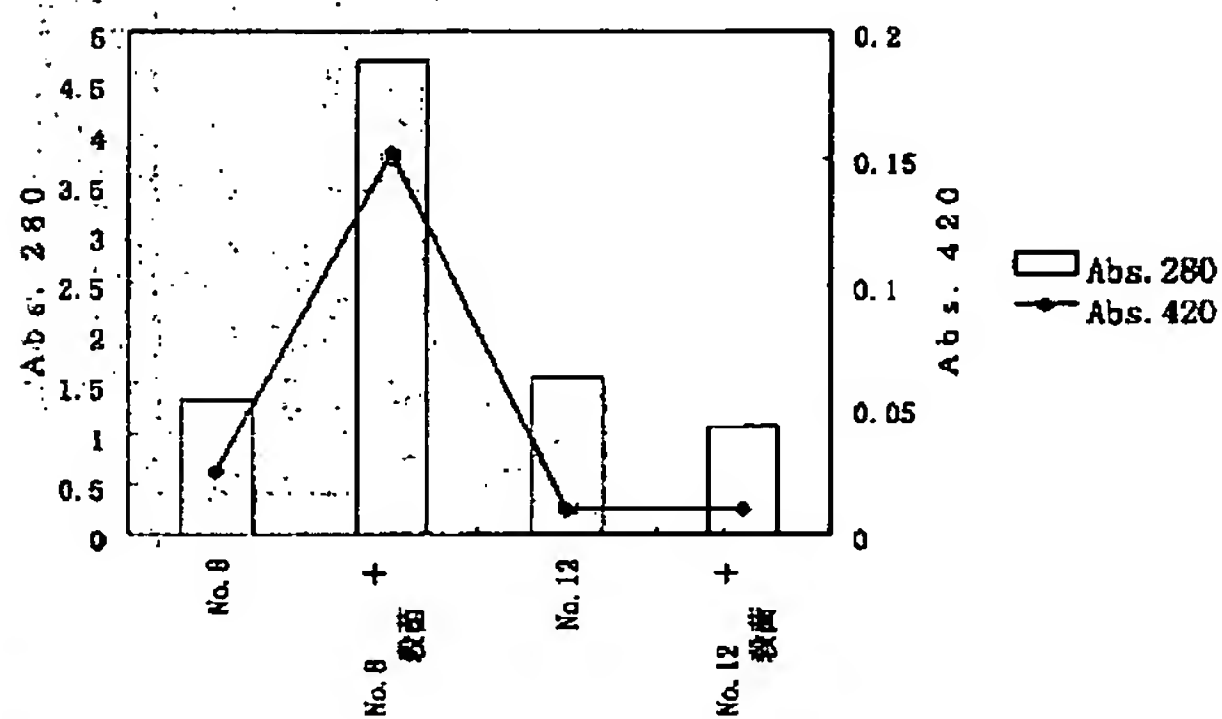
【図2】



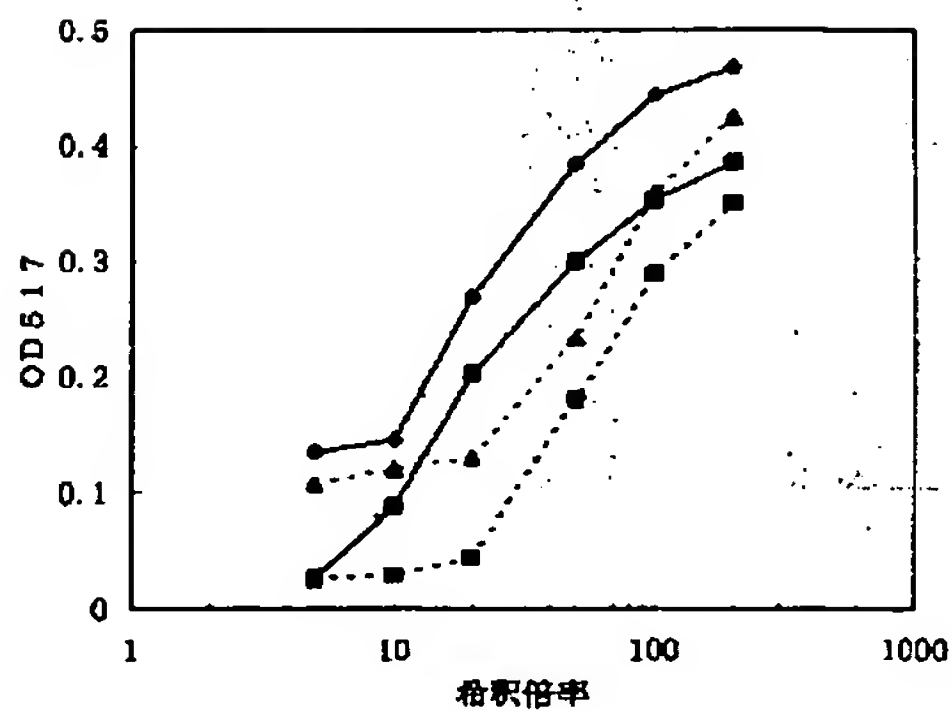
【図3】



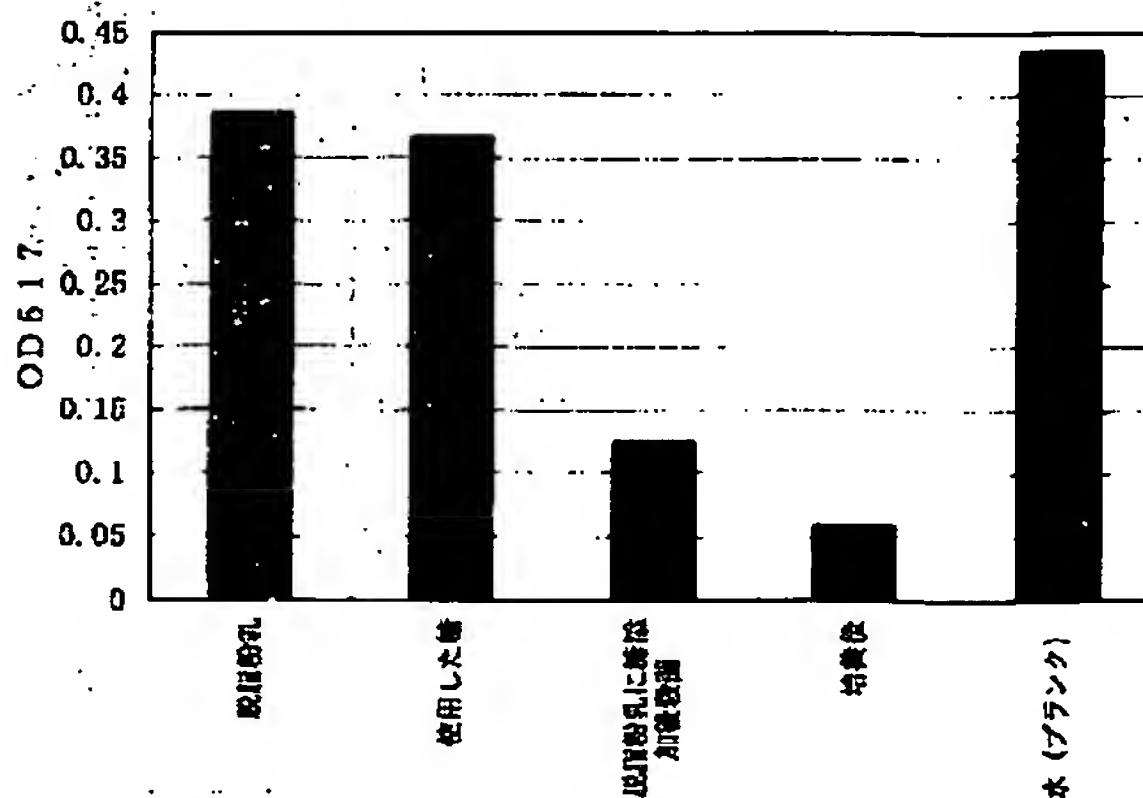
【図4】



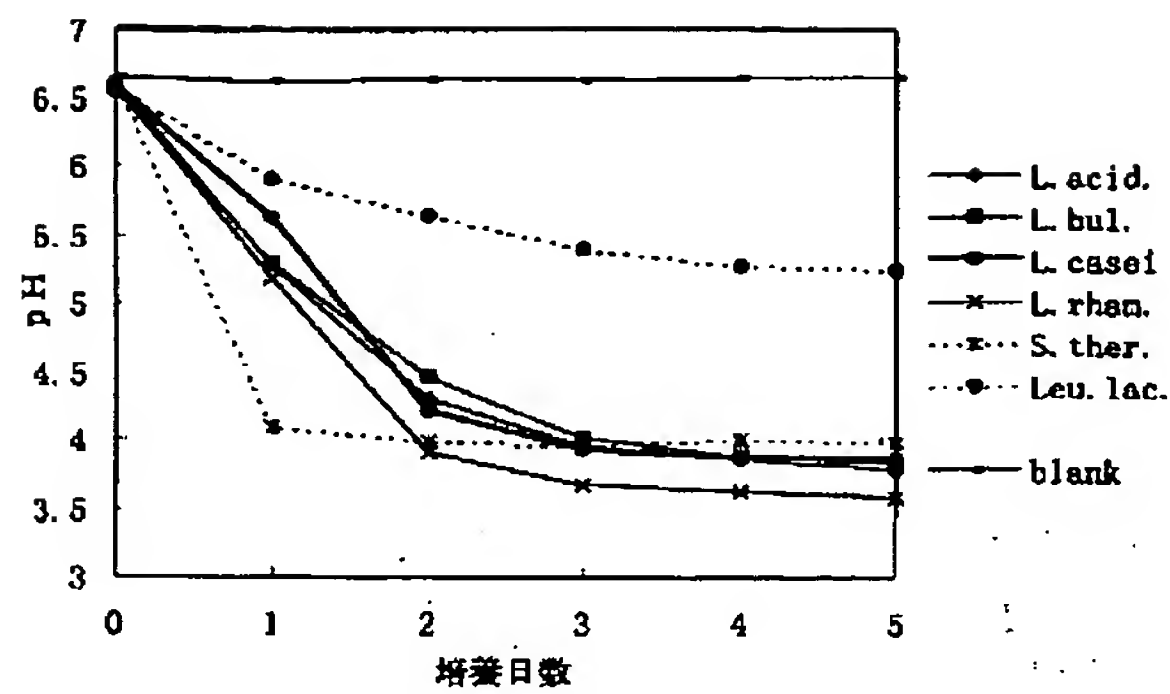
【図5】



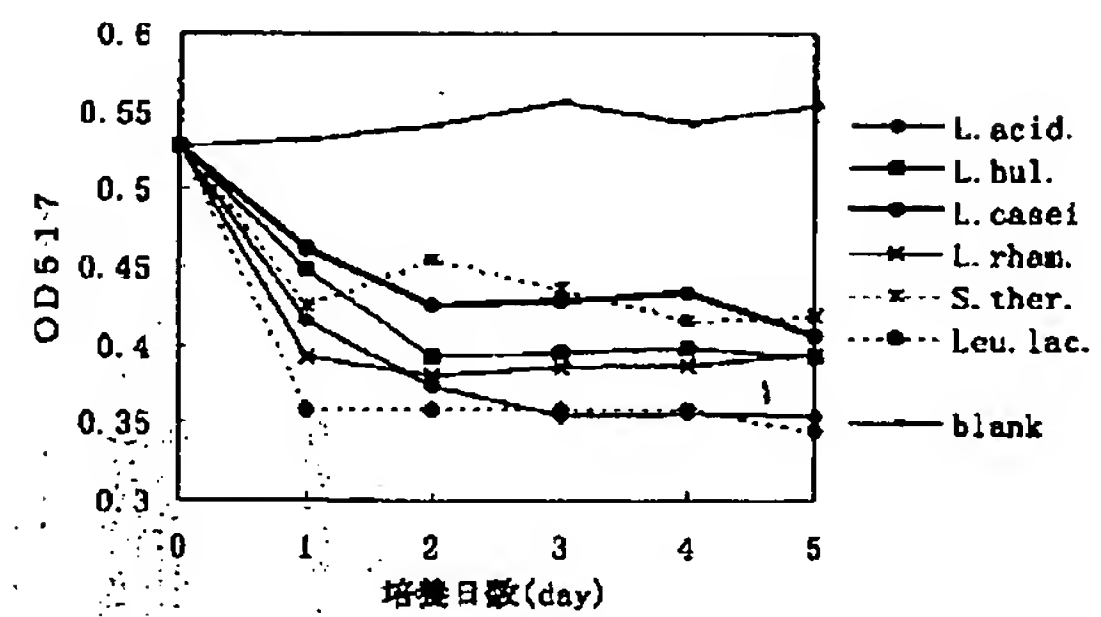
【図6】



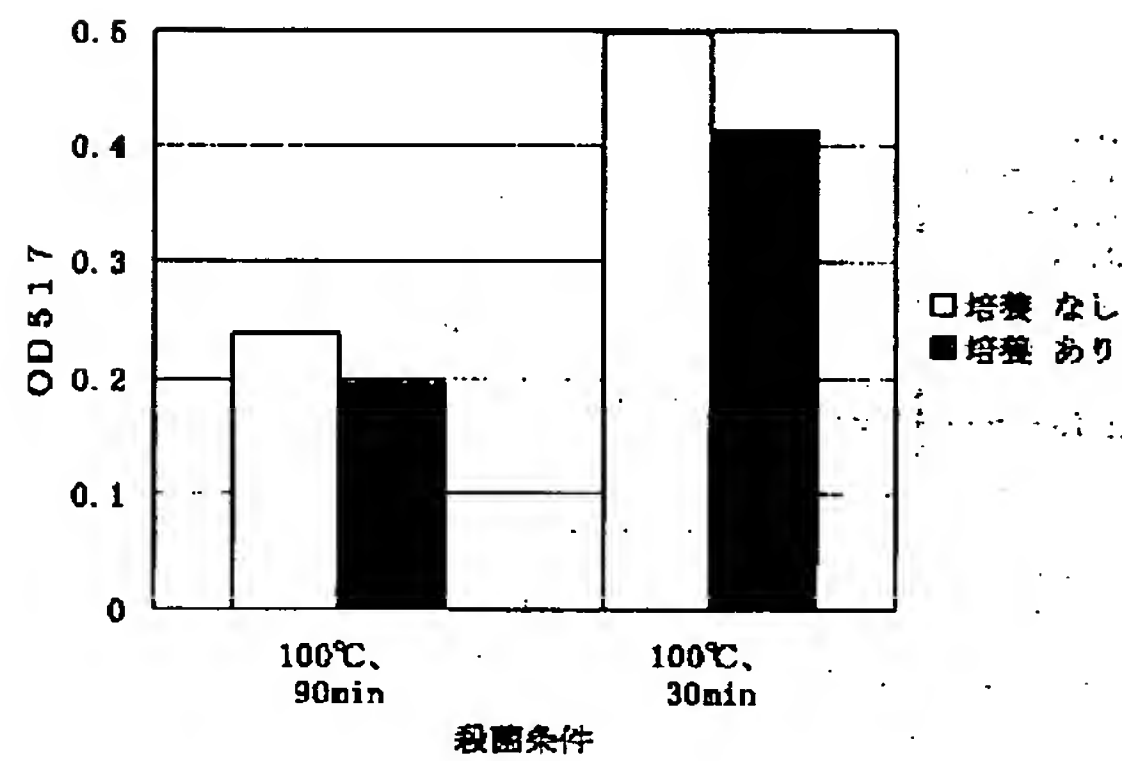
【図7】



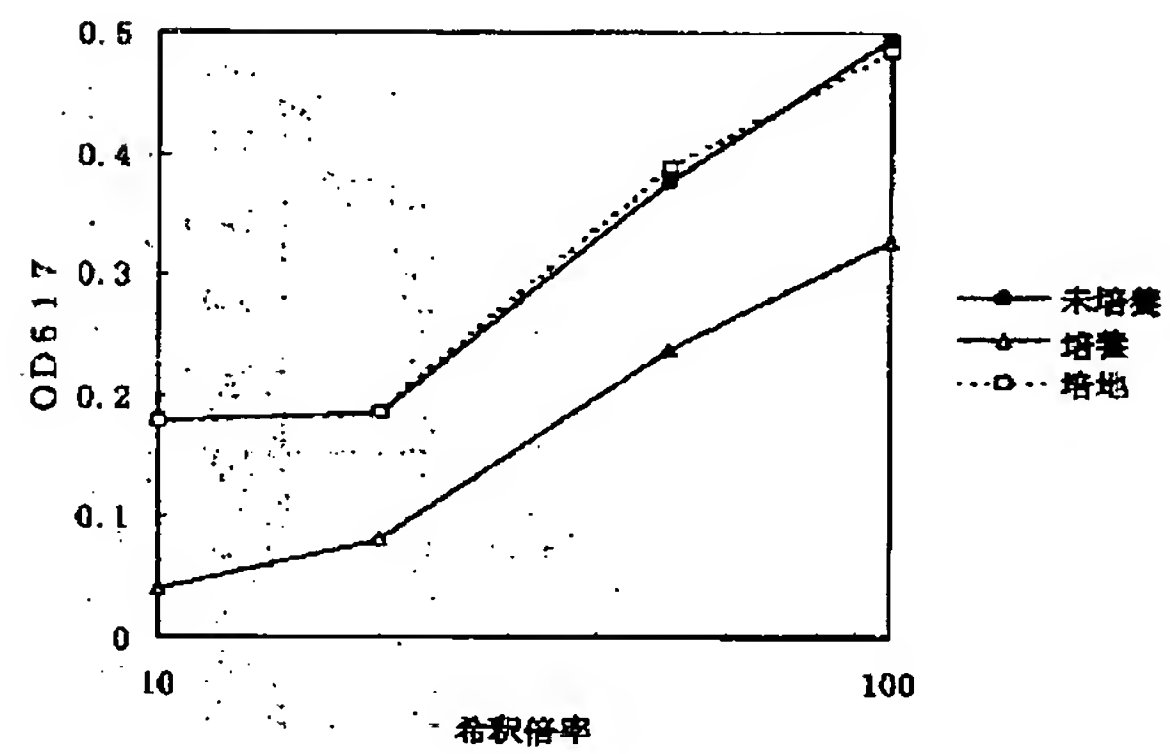
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/20
 C 1 2 R 1:23)
 (C 1 2 N 1/20
 C 1 2 R 1:225)
 (C 1 2 N 1/20
 C 1 2 R 1:245)
 (C 1 2 N 1/20
 C 1 2 R 1:46)
 (C 1 2 N 1/20
 C 1 2 R 1:01)

BEST AVAILABLE COPY